 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.09.19 J South Med Univ, 2015, 35(9): 1316-1319

基础研究

^{99}Tc^{m}标记反义miR208b寡核苷酸及其转染离体肥大心肌细胞的实验研究

王 静,冯会娟,欧阳伟,孙云钢,吴菊清,陈 盼
南方医科大学珠江医院核医学科,广东 广州 510282

摘要:目的 探索用放射性核素^{99}Tc^{m}标记反义miR208b寡核苷酸,并转染离体早期肥大心肌细胞的实验过程及方法。**方法** 合成针对miR208b的反义miR寡核苷酸(AMO),LNA(带锁核酸)修饰AMO,将双功能螯合剂NHS-MAG3(N-羟基琥珀酰亚胺-巯基乙酰基三甘氨酸)与LNA-AMO偶联后,用^{99}Tc^{m} 标记,然后用Sep-Pak C18反相层析法对NHS-MAG3 -LNA- AMO及其标记物进行洗脱纯化,前者同时经Gene Quant DNA/RNA calculator测定在260 nm波长处的吸光度;不同检测方法测定纯化后标记物的标记率、放化纯度、稳定性以及与靶基因杂交的活性;建立由血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的离体心肌肥大细胞模型,检验早期肥大心肌细胞内miRNA208b的相对表达量以及经脂质体包裹的^{99}Tc^{m}-NHS-MAG3-LNA- AMO在早期肥大心肌细胞内的滞留率。**结果** 纯化后的标记物标记率>84%,放化纯度>86%,标记物分别在新鲜人血清、生理盐水中孵育12 h后,放化纯度均大于80%,并具有与靶向基因杂合的能力。离体心肌肥大模型成功建立,测得早期心肌肥大细胞内miRNA208b表达升高,且最终标记物转染细胞后6 h滞留率大于20%。**结论** 在双功能螯合剂NHS-MAG3以及LNA的介导下,成功将放射性核素^{99}Tc^{m}标记于NHS-MAG3-LNA- AMO,最后将反义探针顺利转染早期离体肥大心肌细胞,这为后续的在体心肌肥大核素显像提供重要实验基础。
关键词:miRNA208b;^{99}Tc^{m};反义miR寡核苷酸(AMO);NHS-MAG3;心肌肥大;脂质体

Transfection of hypertrophic cardiac myocytes *in vitro* with ^{99}Tc^{m}-labeled antisense miR208b oligonucleotide

WANG Jin , FENG Huijuan, OU Yangwei, SUN Yungang, WU Juqing, CHEN Pan
Department of Nuclear Medicine, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To test the efficiency of transfecting ^{99}Tc^{m}-labeled anti-miR208b oligonucleotide into early hypertrophic cardiac myocytes *in vitro*. **Methods** The anti-oligonucleotide targeting miR208b (AMO) was synthesized and modified with LNA followed by conjugation with N-hydroxysuccinimidyl S-acetyl-meraptoacetyl triglycine (NHS-MAG3) and radiolabeling with ^{99}Tc^{m}. NHS-MAG3-LNA-AMO and labeled AMO were purified with Sep-Pak C18 column chromatography, and the former was examined for UV absorption at the 260 nm using Gene Quant DNA/RNA calculator. The labeling efficiency, radiochemical purity, stability and molecular hybridization activity were analyzed. An angiotensin II-induced cell model of hypertrophic cardiac myocytes was transfected with ^{99}Tc^{m}-NHS-MAG3-LNA-AMO via liposome, and the relative expression of miRNA208b and retention ratio of the labeled AMO in early hypertrophic cells were determined. **Results** The labeling efficiency and radiochemical purity of the labeled AMO after purification exceeded 84% and 86%, respectively. The radiochemical purities of the labeled AMO incubated in serum and normal saline for 12 h were both higher than 80%, and the labeled AMO showed a capacity to hybridize with the target gene. In the hypertrophic model of cardiac myocytes, the retention ratio of labeled AMO at 6 h was higher than 20%. **Conclusion** The ^{99}Tc^{m}-labeled antisense probe can be efficiently transfected into hypertrophic cardiac myocytes *in vitro*, which provides an experimental basis for subsequent radionuclide imaging studies.
Key words: miRNA208b; ^{99}Tc^{m}; anti-miR oligonucleotide; NHS-MAG3; myocardial hypertrophy; liposome

近年来,分子影像已成为医学影像技术新的研究领域,而基因显像是其中重要组成部分,其中基因显像又包括直接基因显像和间接基因显像,即反义基因显像和报告基因显像,前者即将放射性核素标记的反义探针转染进靶细胞,利用核素显像仪器使得靶细胞内目标基因得到显像,从而达到在基因水平对疾病的定性、定位诊断的目的[1]。最近的研究表明,miRNA208b在未发生形态学改变的早期肥大心肌细胞内高表达,且具有高度心肌特异性[2],而现行的检查方法只能探查已发生形态学改变后的肥大心肌细胞,依然缺乏一种早期的检查手段,根据反义显像原理,若能将核素标记的AMO转染进高表达miRNA208b的心肌细胞内,并与之杂合,就有可能达到早期肥大心肌细胞显像的目的。本实验过程以期为下一步在体早期肥大心肌细胞显像提供实验基础。

收稿日期:2015-03-22
基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800125);广东省自然科学基金项目(10151051501000036);广州市海珠区科技计划项目(048101040005589)
作者简介:王 静,在读研究生,E-mail: 642593927@qq.com
通信作者:欧阳伟,主任医师,硕士生导师,E-mail: oyw1963@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料

Sep-PakC18反相层析柱，美国Waters；Gene Quant DNA/RNA calculator，美国Pharmacia Biotech公司；SN-682型放射免疫γ计数器，上海核福光电仪器有限公司；KDC-2044低温冷冻离心机，科大创新股份有限公司中佳分公司；高锝酸盐$^{99}Tc^{m}O_4$淋洗液，原子高科股份有限公司；阳离子脂质体转染剂（Lipofectamine 2000），美国Invitrogen公司；1~3 d龄雄性SD小鼠，购自南方医科大学动物实验中心，动物批号SCXK（粤）2011-0015。

1.2 方法过程

1.2.1 LNA- AMO的设计和制备　首先从Genbank中搜索到大鼠心肌细胞miRNA208b的基因序列为5'-ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT-3'，根据碱基配对原则，合成针对miRNA208b的AMO，并经LNA修饰。

1.2.2 NHS-MAG_3-LNA-AMO的制备　将NHS-MAG_3溶于无水二甲基甲酰胺(DMF)中，配成浓度为10 mg/mL的溶液。取150 μg的LNA- AMO于60 ℃水浴中静置10 min，溶解于150 mmol/L的无菌$NaHCO_3$缓冲液(pH=8.5)中，最终浓度为5 μg/μL。将NHS-MAG_3以摩尔比为20∶1的比例逐滴加入LNA-AMO溶液中，边滴加边震荡。最终配比液室温静置1 h后经Sep-Pak C18反相层析柱洗脱，洗脱液为30%的乙腈溶液(溶于0.1 mol/L乙酸胺)，收集洗脱液，按每管10 μg分装，经Gene Quant DNA/RNA calculator测定各收集管在260 nm波长处的吸光度值，冷冻干燥后-20 ℃储存备用。

1.2.3 $^{99}Tc^{m}$标记NHS-MAG3-LNA-AMO及标记物的纯化　取一管NHS-MAG_3-LNA- AMO溶液溶解于50 μL 0.25 mol/L的碳酸氢盐缓冲液中，快速依次加入100 μL的N-三甲基甘氨酸(tricine)溶液(70 mg/mL)、3 μL溶于0.1 mmol/L盐酸的$SnCl_2·2H_2O$溶液以及高锝酸盐$^{99}Tc^{m}O_4$淋洗液(约185 MBq)，室温下摇匀3 h，标记完毕。标记物经Sep-Pak C18反相层析纯化，用生理盐水洗脱，经SN-682型放射免疫γ计数器测定洗脱液的放射性计数，经快速小型纸层析法测得纯化后标记率大于84%，放化纯度大于86%。纸层析法的固定相为whatman No.1层析纸，展开剂为V(丙酮)∶V(2 mol/L Hcl)=4∶1。

1.2.4 标记物稳定性及分子杂交活性测定　取等量纯化后的标记物，分别溶解于2倍体积的新鲜人血清、生理盐水中，孵育12 h，用快速小型纸层析法分别测定在2、4、6、8、12 h的放化纯度，根据不同孵育时间放化纯度的改变以评估标记物的稳定性。而分子杂交活性的测定是将纯化后标记物与miRNA208b靶向基因核酸在室温下反应1 h后测定放射性计数，与未杂合的标记物对比，比较两者放射性峰值位置分布的改变。

1.2.5 建立AngⅡ诱导离体心肌肥大细胞模型并测定心肌细胞大小　将新生SD乳鼠经颈椎脱臼法处死，迅速取出心脏，预冷生理盐水清洗血迹，滤纸吸干后，剪去心房及右心室，用眼科剪剪碎左心室组织，加入消化液(胰蛋白酶及I型胶原酶)，于培养振荡器中消化20 min，弃去上清液，重复多次消化后，最终沉淀用RPMI 1640培养液分散成单细胞悬液，经差速贴壁后富集心肌细胞，调节细胞密度均匀种于培养皿，加入RPMI 1640培养液以及AngⅡ 10^{-9} mol/L，在37 °C、5% CO_2饱和湿度条件下培养，分别在培养0、12、24 h时取细胞于6孔培养板上，每孔$1×10^5$细胞，在相差显微镜下用测微器测量心肌细胞直径，每孔观察10个视野，每个视野观察10个细胞，测平均值。

1.2.6 qRT-PCR扩增技术测定早期肥大心肌细胞miRNA208b表达　将AngII诱导培养了0、12、24 h的心肌细胞分别转移至EP管中，加Trizol提取总RNA，步骤按RT-PCR试剂盒示：体系包括待测RNA1 μg，RT产物1 μL、Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)5 μL、上游引物0.4 μL、下游引物0.4 μL及RNase-free H_2O混合至10 μL。PCR循环反应参数为：95 ℃，10 s；60 ℃，20 s；72 ℃，30 s，以U6为内参，测定miRNA208b相对表达量。

1.2.7 脂质体包裹$^{99}Tc^{m}$-NHS-MAG_3-LNA- AMO后转染早期肥大心肌细胞　将4.0 μg $^{99}Tc^{m}$-NHS-MAG_3-LNA-AMO及10 μL阳离子脂质体转染剂Lipofectamine分别稀释于25 μL不含血清及抗生素的RPMI 1640培养液，前者即为a液，后者于室温下孵育10 min，即为b液。将a液与b液混合均匀，室温下放置30 min后，将混合液加入有心肌细胞(培养12 h时)的培养板各孔内，轻轻震荡混匀，置入培养箱内，在37 ℃、5% CO_2饱和湿度条件下培养，分别于3、6、9 h检测细胞的放射性计数，计算细胞内放射性滞留率。

1.2.8 统计学方法　所有数据用均数±标准差表示，使用统计软件SPSS 19.0，组间比较用两独立样本t检验，$P<0.05$有显著意义。

2 结果

2.1 目标产物收集

NHS-MAG_3-LNA-AMO经Sep-Pak C18反相层析柱洗脱后的洗脱液，利用核酸在260 nm处具有增色效应的特点，经Gene Quant DNA/RNA calculator测定其在此波长区域的吸光度，结果图谱中显示两处波峰，分别在第12及30管处出现，即由洗脱液中核酸所引发，这亦说明了收集的产物为目标产物。

2.2 标记物稳定性的检测

标记纯化后的标记物，分别在新鲜人血清、生理盐水中孵育12 h，测定在2、4、6、8、12 h的放化纯度，检测放化纯度如图1、2，由图可看出标记物在新鲜人

血清、生理盐水中，孵育12 h后，其放化纯度均大于80%，稳定性良好。

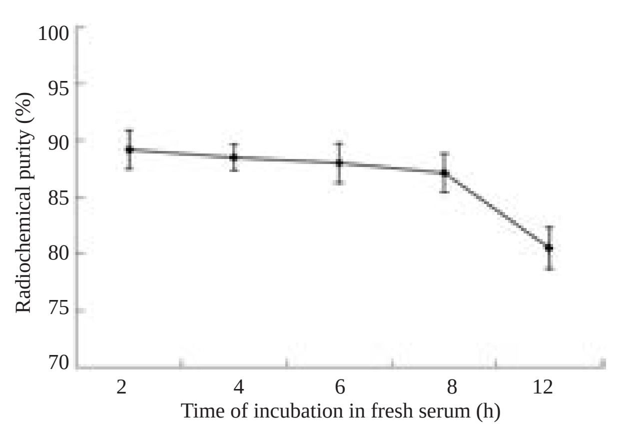


图1 标记物在新鲜血清中孵育后放化纯度的改变

Fig.1 Changes of radiochemical purities of the labeled compounds after incubation in fresh serum.

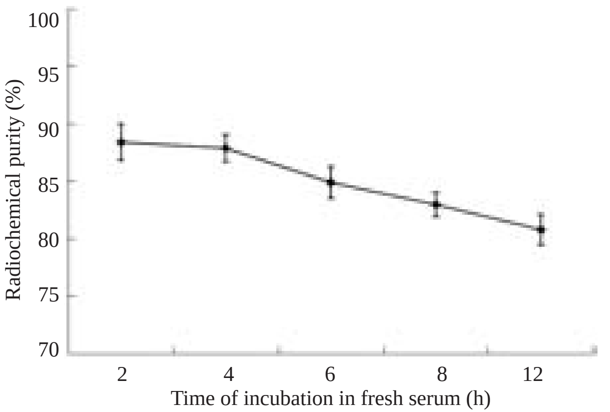


图2 标记物在生理盐水中孵育后放化纯度的改变

Fig.2 Change of radiochemical purities of labeled compounds after incubation in normal saline.

2.3 分子杂交活性的检测

标记物经Sep-Pak C18反相层析纯化后测量洗脱液放射性计数如图3a，标记物与miRNA208b靶基因杂合，纯化后检测洗脱液放射性计数，如图3b。根据Sep-Pak C_{18}反相层析的原理，不同物质按照极性由强至弱的顺序先后被洗脱。杂合后的标记物极性变弱，被洗脱的顺序靠后，致其放射性峰值向后推移，间接说明了制备的标记物具有与靶基因杂合的能力。

2.4 心肌肥大模型的检测

通过AngⅡ诱导心肌肥大模型，于0、12、24 h时测定心肌细胞直径分别为19.252±1.80、20.761±1.76、27.176±1.28 μm，后两组差异有统计学意义（$P<0.05$），而前两组差异无统计学意义（$P>0.05$），表明心肌细胞于24 h时已发生肥大的形态学改变，而12 h时心肌细胞尚处于早期肥大阶段。镜下心肌细胞形态（图4）。

2.5 心肌细胞内miRNA208b的相对量检测

利用qRT-PCR扩增技术测定经*Ang*Ⅱ诱导培养0、

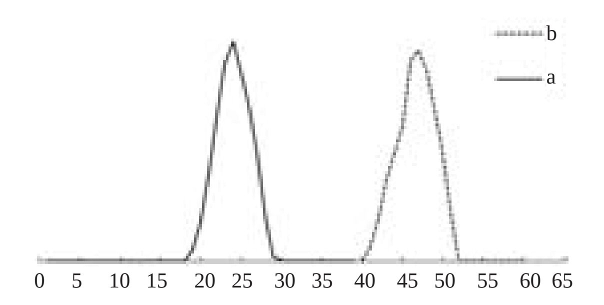


图3 杂合前后的标记物放射性计数变化

Fig.3 Radioactive count of the labeled compounds before (a) and after (b) hybridization.

12、24 h的心肌细胞内miRNA208b的相对量，如图5，可见12 h时miRNA208b相对表达量高于其他时段，且由2.4结果可知，此时心肌细胞正处于早期肥大阶段。

2.6 细胞放射性滞留率

脂质体-^{99}Tc^{m}-NHS-MAG$_3$-LNA-AMO复合物与经*Ang*Ⅱ诱导培养12 h时的离体肥大心肌细胞作用后分别于3、6、9 h检测细胞放射性滞留率，结果分别为13.48±2.59、26.73±1.84及15.62±2.96，两者作用6 h时放射性滞留率达到最高，且大于20%，表明复合物在细胞内停留时间较长，这为后续细胞的显影提供更大的可能性。

3 讨论

核素显像是一种成熟显像技术，被研究较多的核素有^{125}I、^{18}F、^{111}In、^{113}In、^{188}Re、^{99m}Tc等，其中^{99m}Tc是核医学领域应用最广的核素，如Hnatowith等[3]成功将^{99}Tc^{m}标记于DNA，Kang等[4]将^{99}Tc^{m}标记于siRNA，通过无创性方式使得siRNA在体的信息传递过程可视化，且标记物放化纯度大于92%。^{99m}Tc可通过99Mo/^{99}Tc^{m}发生器产生，较其他核素，其放射剂量较小，具有较高的探测率[5]，除此之外，其半衰期适中、显像清晰、价格实惠更是其优势，因而被越来越多的学者应用于分子影像领域。miRNA是近年在真核生物细胞中发现的一种小的高度保守非编码RNA分子，主要通过与靶基因mRNA的碱基配对来调节基因表达[6-7]，从而在细胞增殖、分化、凋亡等过程中起重要作用。miRNA208包括miRNA208a和miRNA208b，是目前发现唯一在心脏特异性表达的miRNA，分别由α-心肌肌球蛋白（α-MHC）重链基因（Myh6）和β-心肌肌球蛋白（β-MHC）重链基因（Myh7）编码，两者的比重变化对心肌肥大的进展起到重要作用[8]。

未经修饰的AMO不稳定，容易降解，为增强其细胞通透性、膜内稳定性以及亲和力，需对其进行修饰，修饰物如LNA（带锁核酸）、2'-OMe（2'-0-甲基）、2'-MOE（2'-0-甲基乙基）、2'-氟（2'-F）、MORF（吗啡样结构）[9]、PNA（肽核酸）等，本研究选用LNA修饰AMO，因为其具有高亲和力，且结合物具有更好的细胞通透性、稳定性和特异性[10]。同时又因裸AMO无法直接携带金属离

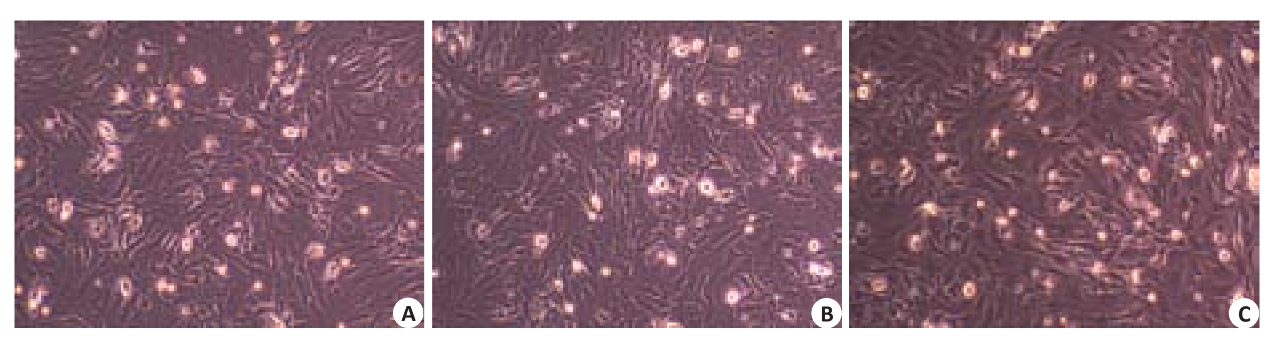


图4 经AngⅡ诱导不同时间后镜下心肌细胞形态

Fig.4 Morphology of AngII-induced cardiac myocytes at 0 (*A*), 12 h (*B*), and 24 h (*C*) during induction (Original magnification: ×100).

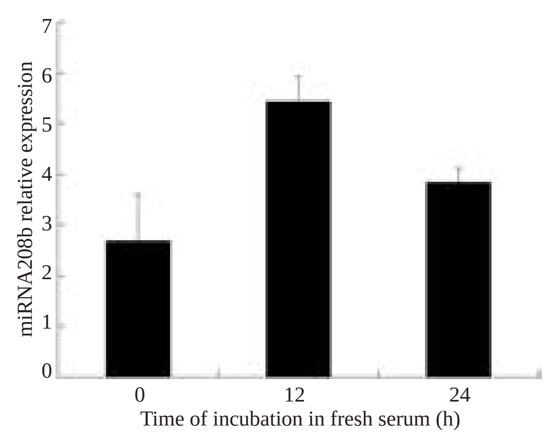


图5 qRT-PCR扩增技术测定心肌细胞内miRNA208b的相对表达量

Fig.5 The relative expression of miRNA208b in the cardiac myocytes detected by qRT-PCR.

子，因此进行核素标记时必须借助双功能螯合剂介导，常见的螯合剂例如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、肼基联氨基烟酰胺(HYNIC)以及N-羟基琥珀酰亚胺-巯基乙酰基三甘氨酸(NHS-MAG_3)，早在1985年Hnatowith等[11]使用DTPA作为抗体蛋白核素标记的螯合剂，后于1997年Winnard等[12]应用二步法合成巯基被乙酰基保护的S-acetyl-NH3-MAG_3，成功将^{99m}Tc标记于DNA，2008年Li等[13]证明NHS-MAG_3的标记产物的标记率和稳定性显著高于HYNIC，同时与血浆蛋白的结合率远低于HYNIC，故本研究选用NHS-MAG_3作为螯合剂。寡核苷酸作为亲水性阴离子多聚体，难以通过带负电荷的细胞膜且易被胞浆内的核酸酶水解，带正电荷的脂质体作为基因载体，因其可以提高转染率，并保护其内的核酸免遭核酸酶分解，而得到广泛应用[14-15]。

本实验证明了早期心肌肥大阶段约于模型建立12 h左右，此时心肌细胞尚未发生明显形态改变且miRNA208b表达特异性升高，奠定了早期心肌肥大核素显像的理论基础。我们最终通过双功能螯合剂NHS-MAG3的介导以及LNA的修饰，成功将^{99m}Tc标记于反义miRNA208b的寡核苷酸(AMO)，并通过脂质体载体将AMO复合物转染进早期肥大心肌细胞，这为后续以miRNA208b为靶点的早期肥大心肌细胞核素显像提供了重要的实验基础。

参考文献：

[1] Skotland T. Molecular imaging: challenges of bringing imaging of intracellular targets into common clinical use[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2012, 7(1): 1-6.

[2] 吴菊清, 欧阳伟, 冯会娟, 等. miRNA-208b在SD大鼠腹主动脉缩窄心肌肥厚中的表达[J]. 广东医学, 2014, 35(14): 2141-4.

[3] Hnatowich DJ, Winnard P, Virzi F, et al. Technetium-99m labeling of DNA oligonucleotides[J]. J Nucl Med, 1995, 36(12): 2306-14.

[4] Kang L, Wang RF, Yan P, et al. Noninvasive visualization of RNA delivery with ^{99m}Tc-radiolabeled small-interference RNA in tumor xenografts[J]. J Nucl Med, 2010, 51(6): 978-86.

[5] Banerjee S, Pillai MR, Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals[J]. Semin Nucl Med, 2001, 31(4): 260-77.

[6] Wu L, Belasco JG. Examining the influence of microRNAs on translation efficiency and on mRNA deadenylation and decay[J]. Methods Enzymol, 2008, 449(8): 373-93.

[7] Feng HJ, Ouyang W, Liu JH, et al. Global microRNA profiles and signaling pathways in the development of cardiac hypertrophy[J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(5): 361-8.

[8] Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2772-86.

[9] Martello G, Zacchigna L, Inui M, et al. MicroRNA control of Nodal signalling[J]. Nature, 2007, 449(7159): 183-8.

[10] Lennox KA, Behlke MA. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides[J]. Gene Ther, 2011, 18(12): 1111-20.

[11] Hnatowich DJ, Virzi F, Doherty PW. DTPA-coupled antibodies labeled with yttrium-90[J]. J Nucl Med, 1985, 26(5): 503-9.

[12] Winnard P, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA[J]. Nucl Med Biol, 1997, 24(5): 425-32.

[13] Li YC, Tan TZ, Zheng JG, et al. Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonictinamide derivative and N-hydroxysuccinimidyl S-acetylmercaptoacetyltriglycline: a comparison of radiochemical behaviors and biological properties[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(14): 2235-40.

[14] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413-7.

[15] Akhtar S, Hughes MD, Khan A, et al. The delivery of antisense therapeutics[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 44(1): 3-21.

(编辑:孙昌朋)